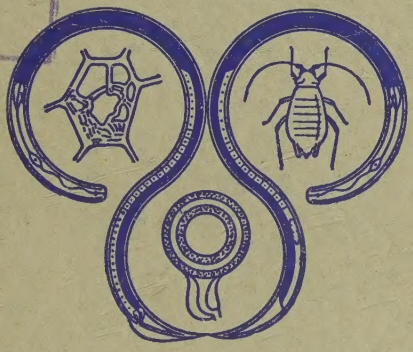
TIJDSCHRIFT OVER PLANTEZIEKTEN

COMMONWEALTH INST. OF ENTOMOLOGY LIBRARY
20 JUN 1960
EU.86

JAARGANG 66 - 1960

1e AFLEVERING



Uitgave van de

NEDERLANDSE PLANTEZIEKTENKUNDIGE VERENIGING

Onder redactie van

Mej. H. L. G. DE BRUYN, Dr. H. H. EVENHUIS,
Dr. J. A. A. M. H. GOOSSENS, Prof. Dr. A. J. P. OORT, Mevr. Ir. M. POST-BAKKER
en Prof. Dr. J. P. H. VAN DER WANT (Secretaris)

Redactie-adres: Laboratorium voor Bloembollenonderzoek,
Heereweg 345*a*, Lisse

BESTUUR

VAN DE NEDERLANDSE PLANTEZIEKTENKUNDIGE VERENIGING

Dr. P. M. L. Tammes, Wageningen, *Voorzitter*
Ir. J. A. J. Veenenbos, Plantenziektenkundige Dienst, Wageningen, *Secretaris*
Dr. A. P. Kole, Lab. v. Fytopathologie, Binnenhaven 4, Wageningen, *1e Penningmeester.*
Postrekening no. 923165 ten name van Penningmeester van de Nederlandse Plantenziektenkundige Vereniging te Wageningen
Mevr. Ir. M. Post-Bakker, Lawickse Allee 80, Wageningen, *2e Penningmeesteresse*
H. P. Dijksterhuis, Garrelsweer
Dr. Ir. C. Mastenbroek, Hoofddorp
Prof. Dr. A. J. P. Oort, Wageningen
W. Tuin, Zuidwolde
Ir. J. Walrave, Wageningen

Lidmaatschap Ned. Planteziektenkundige Vereniging

Nederland, Suriname en de Nederlandse Antillen f 7,50, België f 7,50, Buitenland f 8,50. Leden ontvangen het tijdschrift gratis.

Abonnement Tijdschrift

Nederland, Suriname en de Nederlandse Antillen f 10,—, België f 10,—, Buitenland f 13,50 Betalingen op postrekening 923165 t.n.v. Penningmeester Ned. Planteziektenkundige Vereniging te Wageningen.

Advertentiën

Prijzen per plaatsing : ⅛ pag. f 12,50; ¼ pag. f 20,—; ½ pag. f 30,—; 1 pag. f 55,—.
Bij 3 maal plaatsen van dezelfde advertentie 10 procent korting.
Bij 6 maal plaatsen van dezelfde advertentie 20 procent korting.

Voor plaatsing wende men zich tot de secretaris der Redactie-Commissie, p.a. Heereweg 345*a*, Lisse, tel. 3747, of tot H. Veenman & Zonen N.V. - Wageningen, tel. 2242.

INHOUD

HOOFDARTIKELEN Blz.

J. A. VAN DER VEKEN – Some applications of freeze-drying in virological research. *Met een samenvatting: Enkele toepassingen van het drogen door sublimatie bij het virologische onderzoek* 1

F. A. VAN DER MEER – Onderzoekingen betreffende bessevirussen in Nederland. I. Lepeiblad van rode bes. *With a summary: Investigations of currant viruses in The Netherlands. I. Spoon leaf of red currant* 12

KORTE MEDEDELING

HILLEGONDA J. PFAELTZER – "Rozetziekte" of cherry, transmitted from herbaceous hosts to cherry seedlings. *Met een samenvatting: Rozetziekte van kers, overgebracht van kruidachtige waardplanten op kersen* 24

VERENIGINGSNIEUWS 27

BOEKBESPREKINGEN

F. M. BURNETT & W. M. STANLEY – The viruses, biochemical, biological, and biophysical properties. Volume 2. Plant and bacterial viruses. Academic Press, New York–London. (L. BOS) 27

W. C. MOORE, British parasitic fungi. Cambridge University Press. (G.) 28

J. B. GOODEY, MARY T. FRANKLIN & D. J. HOOPER, Supplement to The nematode parasites of plants catalogued under their hosts, 1955–1958. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Nr. Slough, Bucks. (J. W. SEINHORST) 28

TIJDSCHRIFT OVER PLANTEZIEKTEN

Onder redactie van Mej. H. L. G. DE BRUYN; Dr. H. H. EVENHUIS;
Dr. J. A. A. M. H. GOOSSENS; Prof. Dr. A. J. P. OORT; Mevr. Ir. M. POST-BAKKER
en Prof. Dr. J. P. H. VAN DER WANT (secretaris)

Redactie-adres:
Laboratorium voor Bloembollenonderzoek, Heereweg 345a, Lisse

Drukkers-Uitgevers: H. Veenman & Zonen N.V. – Wageningen

66e JAARGANG (1960)

SOME APPLICATIONS OF FREEZE-DRYING IN VIROLOGICAL RESEARCH[1]

Met een samenvatting: Enkele toepassingen van het drogen door sublimatie bij het virologische onderzoek

BY

J. A. VAN DER VEKEN
Laboratory of Flowerbulb Research, Lisse, The Netherlands

INTRODUCTION

Several precautions are required to store biological material without loss in activity. Often low temperatures are used for this purpose. Sometimes this procedure is not effective in preserving the infectious and antigenic properties of viruses. Thus infectivity and antigenicity of virus S are readily lost in frozen press juice of potato leaves (VAN SLOGTEREN, 1955).

Many changes can be prevented by dehydration, so that enzymatic and chemical processes are completely inhibited. The dehydration should be done under such conditions that no undesired alterations are involved. The only method to be considered then is freeze-drying, in which water is removed from the frozen product in a vacuum.

In recent decades this process has been used for several purposes; however, little information is known about its use in plant virological research. In view of this lack of knowledge, we think it desirable to describe some experiences with the method.

METHODS

The method is based on the principle that water vapour from a frozen product sublimes to the place with the lowest water vapour pressure, which means also, the place with the lowest temperature. The drying process can be made more rapid by application of heat to the frozen product, to compensate for the latent heat of sublimation.

The equipment used for drying is shown schematically in figure 1. It consists of a refrigerator (5) connected with two condensers at a temperature of –55 °C.

[1] Accepted for publication 8 December, 1959.

For freezing and transfer of heat to the material, alcohol can be pumped through the plate (6) and the ring-compartment (7) (both hollow). The heat exchangers are supplied with a heating element as well as a connection with the refrigerator to enable the alcohol to be maintained, at a given temperature.

For drying leaves the unit (2), with the ring-compartment, has several advantages. As compared with the unit (1) several layers of leaves can be dried simultaneously, by placing aluminum strips with holes between the leaves. In this way the drying area is increased. Thick layers of leaves should not be dried, because diffusion is greatly diminished in this way and consequently long drying times are necessary.

The vacuum during drying depends on the material to be dried. With antisera it starts with about 0.2 mm Hg pressure, this is reduced to 0.07 mm at the end of the dehydration process. For leaf material these values are about two or three times higher.

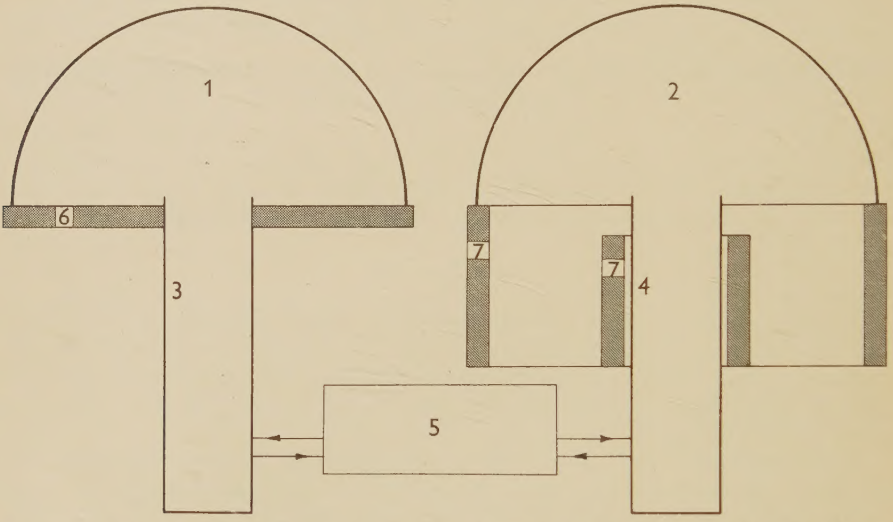


FIGURE 1. Diagram of the apparatus used for freeze-drying. Condensors (3) and (4) are cooled by refrigerator (5). Plate (6) and ring (7) (both hollow) are cooled or heated by alcohol, which is pumped through a heat exchanger. Heat exchangers and vacuum pumps are not drawn.

Schema van de apparatuur voor het drogen door sublimeren. De condensors 3 en 4 worden gekoeld door koelmachine 5. Plaat 6 en ring 7 (beide hol) kunnen gekoeld of verwarmd worden door alcohol, welke via een warmtewisselaar rondgepompt wordt. Warmtewisselaars en vacuumpompen zijn niet getekend.

Weekly changes of vacuum oil are recommended after drying potato leaves as the oil becomes contaminated by non condensable products from the leaves. These substances form combinations with the vacuum oil giving rise to a poor vacuum and poor drying.

There are two possibilities in freezing material before dehydration; either it can be done in the units or in a separate refrigerator at –30 °C. To prevent alterations during freezing and to make use of the maximum capacity of the equipment we used the latter method. In this way the drying capacity of unit (1)

is 1 litre of serum or 400 grams of leaves and for unit (2): 1000–1500 gram of leaves in 24 hours.

Applications of freeze-drying

Particular attention was given to applications closely related to virological and serological research. These concerned: 1. drying of antisera; 2. drying of diseased leaf material to preserve the activity of a number of plant viruses or, if healthy leaves, storing them for absorption of new antisera; 3. drying of leaf material for extraction of inhibiting substances in virus purification.

1. *Drying of antisera*

Serological techniques have proved extremely useful for virus identification and for routine testing of plants for freedom from virus infection. Therefore, the demand for and exchange of antisera has grown substantially in recent years (van Slogteren & van Slogteren, 1957).

In view of the need for big quantities of antisera against potato viruses by The General Netherlands Inspection Service "N.A.K.", we started in 1954 with freeze-drying these antisera.

This opened possibilities for the storage of antisera absorbed with the sap of healthy plants, with the aim of removing antibodies against normal plant proteins. In a few cases an improvement was seen when dried antiserum was compared with the same serum stored at –30 °C, even after a short time of storage. For example this was found with absorbed antiserum against sugar beet yellows virus after three days. High vacuum prevents possibly oxydation processes, which benefits the quality.

Results in table 1 indicate that the titre of dried antiserum against virus X is not greatly affected at high storage temperatures. However, this is not without danger with other antisera. A decrease in antibody content seems to be responsible for the reduction of the titre of antiserum against virus S, stored at high temperatures, and with low concentrations of antigen. This is very important for routine testing of plant material with a low concentration of virus.

In addition to the antisera against the viruses mentioned, good results were obtained by drying absorbed antisera against the following viruses: virus Y, virus M, *Cucumis virus 1* st. Chr., *Phaseolus virus 2*, tomato aspermy virus, mosaic virus and grey virus of daffodils, iris mosaic virus and hyacinth mosaic virus.

The properties of these viruses are described as follows:

hyacinth mosaic virus	(Klinkowski, 1958)
iris mosaic virus	(Brierley & McWhorter, 1936)
mosaic virus and grey virus of daffodils	(van Slogteren & de Bruyn Ouboter, 1941)
rattle virus	(van der Want & Rozendaal, 1948)
tomato aspermy virus	(Blencowe & Caldwell, 1949)
virus M	(Rozendaal & van Slogteren, 1958)
virus S	(Rozendaal & Brust, 1955)
virus Y	(Klinkowski, 1958)
Cucumis virus 1 st. Chr.	(Noordam, 1952)
Phaseolus virus 2	(Klinkowski, 1958)

Storage under atmospheres of different inert gases had no effect on the quality of the antiserum (table 1). It is noteworthy that closing the flasks or ampoules containing the dried material with rubber stoppers was not satis-

TABLE 1. Effect of different gases and temperatures on the titre of dried absorbed antisera.
Invloed van verschillende gassen en temperaturen op de titer van gedroogde verzadigde antisera.

Antiserum	Antigen *Antigeen*	Titre of dried antiserum stored *Titer van gedroogd antiserum na bewaren*					
		in *onder*	during days *gedurende dagen*	at *bij*			
				−15 °C	+9 °C	+20 °C	+35 °C
Absorbed antiserum against virus X (1 : 10) *Verzadigd antiserum tegen X-virus (1 : 10)*	Press juice of tobacco leaves infected with virus X *Perssap van tabaksblad geïnfecteerd met X-virus*	Air *Lucht*	0	1/480	–	1/480	1/480
		Id.	80	1/480	–	1/480	1/480
		Id.	140	1/480	–	1/480	1/480
		Id.	380	1/480	–	1/480	1/480
Absorbed antiserum against virus S (1 : 5) *Verzadigd antiserum tegen S-virus (1:5)*	Press juice of potato leaves with virus S + 4 parts of sap of healthy potato leaves *Perssap van aardappelblad met S-virus + 4 delen sap van gezond aardappelblad*	Air *Lucht*	90	1/320	1/320	1/160	–
		CO_2	90	1/320	1/320	1/160	–
		N_2	90	1/320	1/160	1/160	–
		H_2	90	1/320	1/320	1/160	–

factory. It was concluded that diffusion of water vapour through the stoppers will raise the moisture content above a point were damage could occur. According to our experience only paraffining the stoppers or sealing of the glass is satisfactory.

The serum to be dried should be frozen very well, otherwise there will be foaming in the drying process. The residues of these sera do not redissolve completely afterwards, though, serological activity does not seem to be greatly diminished.

2. *Drying of diseased leaf material to preserve the activity of a number of plant viruses or, if healthy leaves, storing for absorption of new antisera*

There are many differences between drying of antiserum and leaves. In the first process water is removed from a homogeneous frozen product. The time of drying depends largely on three factors: temperature of the condenser, the vacuum and transfer of heat to the frozen product. With leaves it is more complicated as water vapour from the cell must first pass the cell membranes and cell walls. So the procedure is much more time consuming. Depending on the process of freezing these cell walls or membranes are more or less damaged and this affects the rate of diffusion.

By rapid freezing at low temperatures the size of the ice crystals is reduced, as compared with the crystals resulting from slow freezing at higher temperatures. With smaller ice crystals disruption of cell walls is usually avoided (FLOSDORF, 1950b). Quikly frozen tissues should be permitted to warm only very slowly to the dehydration temperature, otherwise ice crystals will grow too fast and morphological changes will be produced. Though freezing and drying at low temperatures would be quite possible, there are practical reasons why it would rarely be done. The vapour pressure of ice becomes very low at these temperatures and consequently it would take too much time to dehydrate the material. So a choice has to be made between several different possibilities.

A good method turned out to be, to freeze the leaves in a refrigerator at –30 °C and put them afterwards directly in the drying unit. (The temperature of the plate or ringcompartment was first held at –20 °C, but in later experiments the circulation pump was not used.) Heat is then supplied by radiation from outside. Care should be taken not to heat the leaves too much, as thin leaves are easily thawed. After drying, leaves are put in flasks (Weck) and stored under vacuum. This is done by evacuating the flask with a clamp on it, in the drying equipment.

Leaves with a thick layer of wax are especially difficult to dehydrate. Tobacco leaves dry much more quickly than sugar beet or hyacinth leaves. Some volatile substances removed from potato leaves during drying are not condensed, but move into the vacuumpump. Consequently the vacuum is affected unfavourably.

ROZENDAAL & VAN SLOGTEREN (1958) used freeze-dried potato leaves infected with virus S and virus M for the production of antisera. No influence of the drying procedure was found. The same holds for other viruses as will be described later on.

More interesting is the infectivity of viruses stored in dried tobacco leaves. Suspensions obtained by grinding freeze-dried tobacco leaves infected with virus Y, rattle virus or *Cucumis virus 1* st. Chr., with 9 volumes of phosphate buffer pH 7.1, produced the well known symptoms on White Burley tobacco.

These leaves had been stored for 9 months at 7 °C. Freeze-dried expressed juice of tobacco leaves infected with virus Y was also infectious, when stored under the same conditions.

The freeze-drying technique offers good prospects of preserving leaves of healthy plants, so that uniform material can be collected. Use can also be made of it for research studies or absorption of antisera.

3. *Drying of leaf material for extraction of inhibiting substances in virus purification*

Cytoplasm of plant cells sometimes contains substances interfering with the serological or biological properties of the virus. Tannins especially are known for their inhibiting effect on infectivity. These substances may be removed by extraction with organic solvents. Several viruses are able to resist extraction with chloroform, but there is always a possibility that denaturation will occur (STEERE, 1959).

ROZENDAAL & VAN SLOGTEREN (1958) described a purification method for virus S and virus M, in which leaves were extracted with chloroform, acetone and ether. This method proved to be of value also in the purification of the following plant viruses: virus Y, rattle virus, tomato aspermy virus, *Cucumis virus 1* st. Chr. mosaic and grey virus of daffodils, hyacinth mosaic virus and iris mosaic virus.

Some fractions obtained in this purification process were examined more closely (scheme 1). In fractions I, II and III one or more ultraviolet light absorbing substances could be detected with chromatography, probably all tannins. Chlorophyll is mainly found in fraction I. Physico-chemical studies of virus solution VI revealed proteins with sedimentation constants of 19S and 80S. These constituents are also found in higher concentrations in undried plants. The reduction in concentration of the 80S component during purification is very striking. Inoculations with the fractions IV and VI, obtained from tobacco leaves infected with virus Y and *Cucumis virus 1* st. Chr., stored for 10 months at 7 °C., were successful. Some sediments such as those from fractions IV and VI were also infective, but this seemed to be due to adsorption of virus on to cell constituents. There are indications that such adsorption may be lower when fresh material is used, but results were not consistent.

DISCUSSION

Freeze-drying of biological material offers many advantages. Labile substances can often be preserved without loss in activity. The absence of water prevents harmful reactions, such as may occur with chilled or frozen products. For example, antigenicity and infectivity of virus S are readily lost at low temperatures (VAN SLOGTEREN, 1955).

The results of this work indicate the beneficial effect of freeze-drying on the keeping qualities of antisera against plant viruses. This is important for distribution and exchange of these sera. The advantages are also obvious for antisera absorbed with proteins of healthy plants. This procedure may now be carried out whenever good plant material is available.

Dried antisera should not be stored at high temperatures or loss in activity will occur. Replacement of air in the ampoules, with inert gases does not improve the results. Probably oxygen may be absorbed by the highly porous

matter and can not be completely swept out afterwards (FLOSDORF, 1950a, b). Ampoules should be preferably sealed by fusion of glass as diffusion of water vapour through rubber stoppers will decrease the keeping qualities. Further work will be necessary to study the effect of secondary drying with phosphorus pentoxide on the properties of dried antisera.

Promising results were obtained with viruses stored in dried leaves. Although changes in the cell during freezing cannot be completely avoided, infectivity is partly maintained. The same phenomenon has been observed with animal viruses. Further experiments are necessary to decide how far this property is maintained. However, some loss in infectivity has only a limited significance for infecting healthy plants. Freeze-drying could thus be of value for the maintenance of stock cultures of plant viruses. Biological activity of virus Y is also preserved in dried expressed sap. This method is not suitable when the virus is inactivated by substances in the sap.

Use can be made of dehydrated material in the purification of plant viruses. Some cell constituents are inhibitors of infectivity, others are poisonous and cause difficulties in the preparation of antisera (VAN SLOGTEREN, 1955). The aim of purification is the removal of these substances. Extraction with organic solvents, such as chloroform, removes most of this material. Several viruses will withstand this treatment (STEERE, 1959), although denaturation is always a possibility.

For infectivity experiments inhibitors should be removed before reaction with the virus can take place. This is possible only with unaltered freeze-dried material. Tannins can be extracted with alcohol, and in this way biological and serological activity of virus X and tobacco mosaic virus are not reduced (VAUGHAN, 1956). Antigenic properties of virus S and virus M are unaffected by extraction with chloroform, acetone and ether, but chlorophyll, tannins and alkaloids are removed by the treatment (ROZENDAAL & VAN SLOGTEREN, 1958). This applies also for the following viruses: virus Y, rattle virus, tomato aspermy virus, mosaic virus and grey virus of daffodils, hyacinth mosaic virus and iris mosaic virus.

With some viruses infectivity is unaffected, even partially. With others further quantitative experiments are necessary to decide how far infectivity is maintained.

To prevent changes during freeze-drying several precautions are necessary. Attention should be given to the following points, already described for animal tissues. Firstly, separation of solvent and dissolved components in the cell must be prevented. Secondly, the size of the ice crystals should be as small as possible to reduce damage to the cell structure. Both conditions are fulfilled by freezing and drying at low temperatures. Unfortunately in these low temperature ranges the vapour pressure of ice becomes very low and consequently dehydration takes too long. In our experiments the temperature of the product has been held at –20 °C and this seems to have had no adverse effect on the properties of the viruses. Other proteins were affected to greater or less degree such as the 80S component.

There are big differences in the procedure needed for drying of antisera and leaves. When drying leaves more attention must be paid to the diffusion of water from the frozen product, because of the obstruction of the cell walls. Removal of evaporated water is of great importance, so it is valuable to have a

good vacuum and a short distance to the condenser. According to MERYMAN (1959) dehydration of animal tissue can be achieved by conducting a continuous stream of dry air over the frozen material held at a low temperature. As it is difficult to establish a good contact between big quantities of leaves and the stream of air this method does not seem suitable for our work.

In spite of some defects freeze-drying is preferable to collect quantities of homogeneous plant material. The method is especially useful in the purification of viruses, that are present in plants only in low concentrations.

SUMMARY

Storage of antisera against plant viruses and leaf material from virus infected plants is simplified by application of freeze-drying. Dehydrated plant material is of great value for the removal of virus inhibiting substances by organic solvents. Several plant viruses are unaffected by this drying procedure.

SAMENVATTING

Biologische stoffen kunnen na drogen door sublimatie, zonder verlies aan activiteit, op eenvoudige wijze lange tijd bewaard worden. Goede resultaten werden geboekt bij het bewaren van verzadigde antisera tegen de volgende plantevirussen: X-virus, Y-virus, M-virus, *Cucumis virus 1* st. Chr., tomaataspermyvirus, narcissemozaïekvirus, narcissegrijsvirus, *Phaseolus virus 2*, irisvirus en hyacintevirus. In tabel 1 wordt de invloed van enkele bewaartemperaturen en gassen op de serologische activiteit weergegeven. Uit deze resultaten blijkt een nadelige invloed van hogere bewaartemperaturen op de hoeveelheid antibodies. Vooral voor het diagnostische onderzoek is dit van groot belang.

Ook voor het conserveren van bladmateriaal, al dan niet geïnfecteerd met plantevirus, opent deze methode belangrijke perspectieven. Niet alleen de antigeniteit maar ook het infectievermogen van Y-virus, ratelvirus en *Cucumis virus 1* st. Chr. uit gedroogd tabaksblad blijkt na 9 maanden bewaren bij 7 °C nog grotendeels aanwezig te zijn. Bij deze experimenten werd White Burley tabak geïnfecteerd met een suspensie die verkregen wordt door gedroogd blad fijn te wrijven met 9 delen fosfaatbuffer pH 7,0. Nader onderzoek zal moeten leren in hoeverre het infectievermogen ook kwantitatief onaangetast blijft.

Gedroogd materiaal is van belang voor het verwijderen van verbindingen die remmend werken op eigenschappen van een virus. VAUGHAN (1956) gebruikte extractie met alcohol voor de verwijdering van tanninen, terwijl ROZENDAAL & VAN SLOGTEREN (1958) bij de zuivering van S- en M-virus voor antiserumbereiding een extractie met chloroform, aceton en ether toepasten. Deze methode bleek ook goede resultaten op te leveren bij de bereiding van antisera tegen: X-virus, Y-virus, narcissemozaïek en narcissegrijsvirus, hyacintevirus, irisvirus, *Cucumis virus 1* st. Chr. en tomaataspermyvirus.

De eigenschappen van deze virussen zijn beschreven in de volgende literatuur:

hyacintegrijsvirus	(KLINKOWSKI, 1958)
tomaataspermyvirus	(BLENCOWE & CALDWELL, 1949)
irismozaïekvirus	(BRIERLEY & MCWHORTER, 1936)
mozaïekvirus en grijsvirus van narcis	(VAN SLOGTEREN & DE BRUYN OUBOTER, 1941)
ratelvirus	(VAN DER WANT & ROZENDAAL, 1948)
M-virus	(ROZENDAAL & VAN SLOGTEREN, 1958)

S-virus	(Rozendaal & Brust, 1955)
Y-virus	(Klinkowski, 1958)
Cucumis virus 1 st. Chr.	(Noordam, 1952)
Phaseolus virus 2	(Klinkowski, 1958)

Bij genoemde extractie worden, volgens chromatografisch onderzoek, zowel giftige stoffen (alkaloïden) als stoffen die de virusactiviteit remmen (tanninen) verwijderd. Zelfs blijken de fracties IV en VI (schema 1) in het geval van Y-virus en *Cucumis virus 1* st. Chr. nog sterk infectieus. Genoemde virussen werden 10 maanden bij 7 °C in tabaksblad bewaard.

Volgens fysisch-chemisch onderzoek treedt vooral een sterke vermindering op van de 80S component in de fractie VI na zuivering.

De apparatuur, welke gebruikt werd, is schematisch weergegeven in fig. 1. Condensors worden door koelmachine op –55 °C gehouden. Materiaal liefst invriezen bij –35 °C in diepvrieskast. Het vacuüm is sterk afhankelijk van het materiaal dat gedroogd wordt. Bij serum bedraagt dit aan het begin 0,2 mm kwikdruk, welke waarde daalt tot 0,07 mm kwikdruk; voor blad liggen deze waarden twee- tot driemaal zo hoog.

In de discussie worden de verschillende voorwaarden, waarmee men bij het drogen door sublimatie rekening moet houden, nader besproken.

Acknowledgment

The author wishes to thank particularly Miss N. P. de Vos for the experimental work.

References

Blencowe, J. W. & J. Caldwell, – 1949. Aspermy – a new virus disease of the tomato. Ann. appl. Biol. 36: 320–326.

Brierley, P. & F. P. McWhorter, – 1936. A mosaic disease of iris. J. agr. Res. 53: 621–635.

Flosdorf, E. W., – 1950a. Technic and application of drying viruses in the frozen state. In Handbuch der Virusforschung von R. Doerr & C. Hallauer. Springer Verlag, Wien.

Flosdorf, E. W., – 1950b. Quick-freezing and the freezing-drying process. In Biophysical research methods by F. M. Uber. Interscience Publishers, Inc., New York.

Klinkowski, M., – 1958. Pflanzliche Virologie II. Die Virosen des europäischen Raumes. Akademie Verlag, Berlin.

Meryman, H. T., – 1959. Sublimation freeze-drying without vacuum. Science 130: 628–629.

Noordam, D. – 1952. Virusziekten bij chrysanten in Nederland. T. Pl.ziekten 58: 121–189.

Rozendaal, A. & J. H. Brust, – 1955. The significance of potato virus S in seed potato culture. Proc. 2nd. Conf. Potato Virus Diseases, Lisse-Wageningen, 1954: 120–133.

Rozendaal, A. & D. H. M. van Slogteren, – 1958. A potato virus identified with potato virus M and its relationship with potato virus S. Proc. 3rd. Conf. Potato Virus Diseases, Lisse-Wageningen, 1957: 20–37.

Slogteren, D. H. M. van, – 1955. Preparation of antisera against potato virus S with special reference to the preparation of non-toxic virus-suspensions for the immunization of rabbits from extracts of infected potatoplants. Proc. 2nd Conf. Potato Virus Diseases, Lisse-Wageningen, 1954: 35–39.

Slogteren, E. van & M. P. de Bruyn Ouboter, – 1941. Onderzoekingen over virus-ziekten in bloembolgewassen I. Narcissen I. Meded. Landbouwhoogeschool 45, 3: 1–32.

Slogteren, E. van & D. H. M. van Slogteren, – 1957. Serological identification of plant viruses and serological diagnosis of virus diseases of plants. Ann. Rev. Microbiol. 11: 149–164.

Vaughan, E. K., – 1956. A device for the rapid extraction of tannins from virus infected plant tissues before extraction of inoculum. T. Pl.ziekten 62: 266–270.

Want, J. P. H. van der & A. Rozendaal, – 1948. Electronenmicroscopisch onderzoek van het virus dat de ratelziekte van de tabak en het stengelbont van de aardappel veroorzaakt. T. Pl.ziekten 4: 131–141.

SCHEME 1. Purification of plant viruses from dried leaves for antisera production.
Zuivering van plantevirussen uit gedroogd blad voor bereiding van antisera.

Homogenize 1 gram of freeze-dried leaves with 40 ml chloroform, filter through sintered glassfilter.
1 gram gedroogd blad homogeniseren met 40 ml chloroform, filtreren door glazen filterkroes.

Suspend material on glassfilter in 20 ml chloroform and filter after 30 min.
Materiaal op glasfilter suspenderen in 20 ml chloroform, na 30 min. filtreren

Chloroform extract

Suspend material in 20 ml acetone and filter after 30 min.
Materiaal suspenderen in 20 ml aceton en na 30 min. filtreren

Chloroform extract

Fraction I

Suspend material in 20 ml ether and filter after 30 min.
Materiaal suspenderen in 20 ml ether en na 30 min. filtreren

Acetone extract Fraction II

After drying, homogenize material with 30 ml phosphatebuffer pH 7.1 with 0.3% KCN and 0.3% $NaHSO_3$. Filter through cheesecloth and centrifuge 10 min. at 3000 r.p.m.
Materiaal drogen in vacuum, homogeniseren met 30 ml fosfaatbuffer pH 7,1, met 0,3% KCN en 0,3% $NaHSO_3$. Filtreren door kaasdoek en 10 min. 3000 t.p.m. centrifugeren

Ether extract Fraction III

Suspend sediment in 6 ml phosphatebuffer pH 7.1, centrifuge 5 min. at 1500 r.p.m.
Sediment suspenderen in 6 ml fosfaatbuffer 7,1, 5 min. centrifugeren bij 1500 t.p.m.

Sediment

Solution
Oplossing

Solution
Oplossing

Fraction IV

Fraction IV, centrifuge 45 min. at 50000 g
Fractie IV, centrifugeren 45 min. 50000 g

Solution
Oplossing

Resuspend sediment in 0.8% NaCl, 1/15th of the volume of fraction IV, dialyse against water, add afterwards 8.5 mg NaCl for every ml solution (Fraction V) and centrifuge 5 min. at 1500 r.p.m.

Sediment oplossen in 0,8% NaCl, 1/15 van het volume van fractie IV, dialyseren tegen leidingwater, daarna per ml oplossing 8,5 mg NaCl toevoegen (Fractie V) en 5 min. bij 1500 t.p.m. centrifugeren

Resuspend pellet in 0.8% NaCl 1/2 of the volume of fraction V, centrifuge 5 min. at 1500 r.p.m.

Sediment suspenderen in 0,8% NaCl, 1/2 volume van fractie V, 5 min. centrifugeren bij 1500 t.p.m.

Sediment

Virus solution
Virusoplossing

Virus solution
Virusoplossing

Virus solution Fraction VI
Virusoplossing Fractie VI

T. Pl.ziekten 66 (1960): 12–23

ONDERZOEKINGEN BETREFFENDE BESSEVIRUSSEN IN NEDERLAND

I. LEPELBLAD VAN RODE BES[1]

With a summary: Investigations of currant viruses in The Netherlands

I. Spoon leaf of red currant

DOOR

F. A. VAN DER MEER

Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek, Wageningen

INLEIDING

Een van de belangrijkste rode-bessecentra in Nederland is het fruitteeltgebied in Noordholland, dat met de naam „de Bangert" wordt aangeduid. Strikt genomen is Bangert een buurtschap, die gedeeltelijk tot de gemeente Zwaag en gedeeltelijk tot de gemeente Blokker behoort. Als men in de fruitteelt over „de Bangert" spreekt bedoelt men echter veelal een groter gebied. IGNATIUS (1943) schrijft over „de Bangert": „Dit laatste centrum omvat een gedeelte van West-Friesland met o.a. de plaatsen Wognum, Blokker, Zwaag, Schellinkhout en Wijdenes". SPRENGER (1948) vermeldt voor „de Bangert" 1026 ha fruitteelt en bedoelt dus ook „de Bangert" in ruimere zin. Waar derhalve in dit artikel sprake is van „de Bangert" wordt niet de buurtschap bedoeld doch het fruitteeltcentrum. Volgens de Tuinbouwgids (1959) bedroeg in 1957 de aanvoer van rode en witte bessen op de veilingen Zwaag en Blokker tezamen 500.000 kg, hetgeen ruim 10% is van de totale Nederlandse produktie. Voor een groot gedeelte wordt de teelt van rode bessen in „de Bangert" nog bedreven als onderteelt in oude halfstamboomgaarden met een zeer gevarieerde en onregelmatige beplanting van verschillende soorten appels, peren en pruimen. Het instandhouden van die tuinen geschiedt door jaarlijkse incidentele vervanging van de slechte vruchtbomen en bessestruiken. Deze typisch Bangertse teeltwijze is reeds eeuwen oud en bedrijven waar al 100 jaar achtereen bessen op dezelfde grond worden geteeld zijn in „de Bangert" geen zeldzaamheid. Hoewel binnen korte afstanden soms vrij sterke verschillen optreden kan de grondsoort in „de Bangert" in het algemeen worden aangeduid als zware zavel tot lichte klei.

Een van de meest voorkomende besseziekten in deze oude tuinen is lepelblad, een virusziekte welke - volgens mededelingen van oudere tuinders - reeds omstreeks 1920 bekend was. Voor zover schrijver heeft kunnen nagaan werd de naam lepelblad of „lepelvormigheid" voor het eerst gebruikt door MAARSE (1926) en later ook door VAN POETEREN (1926), RIETSEMA (1943) en HUS (1944). MAARSE geeft een duidelijke, zij het beknopte, beschrijving van de ziekte. VAN KATWIJK (1953) vermeldt, dat lepelblad kan worden overgebracht door enten. De ziekte is voornamelijk beperkt tot „de Bangert" en komt in andere delen van ons land niet of nauwelijks voor. Uit het buitenland zijn geen gegevens bekend over het voorkomen van lepelblad.

[1] Aangenomen voor publikatie 20 januari 1960.

Materiaal en methodiek

De entproeven werden uitgevoerd volgens de zg. „bottle grafting" methode, die door Cadman (1951) gebruikt werd ten behoeve van zijn onderzoek over frambozevirussen. Bij deze manier van enten wordt zowel van de ent als van de onderstam een stukje bast losgesneden. De beide zo verkregen lipjes worden op elkaar geschoven, waarna het geheel met kleefpleister wordt omwonden. Het ondereind van de ent wordt vervolgens in een buisje met water geplaatst om uitdroging te voorkomen.

Als toetsplanten werden jonge besseplanten gebruikt, die gegroeid waren uit stek van door de N.A.K.-B goedgekeurde moederstruiken. De planten werden opgekweekt in een luisdicht warenhuis. In december, ongeveer vier maanden na het enten, werden de planten buiten opgeplant tezamen met een aantal niet-geënte controleplanten.

Sapinfecties werden uitgevoerd met sap uit zeer jong besseblad, waaraan vóór het uitpersen een ongeveer gelijke gewichtshoeveelheid water was toegevoegd. Het op die wijze verkregen perssap werd uitgewreven op tabaksplanten, die tevoren met carborundum waren bestoven. Wanneer geen jong besseblad beschikbaar was, bv. in het najaar of in de winter, dan werden knoppen van éénjarige scheuten gebruikt. Deze knoppen werden ontdaan van de schubben en alleen het binnenste zachte gedeelte van de knop, met de bloem en bladprimordiën werd gebruikt voor sapproduktie. Aan dit materiaal werd vóór het uitpersen een drie- tot viermaal grotere gewichtshoeveelheid water toegevoegd. De infectie gelukte niet als de knopschubben niet werden verwijderd.

Symptomen op rode bes

Deze bestaan uit misvorming van de bladeren, waarbij in extreme gevallen de insnijdingen tussen de bladlobben vrijwel geheel verdwijnen en het aantal tanden in de bladrand sterk vermindert. Soms ontbreekt de tanding in de bladrand geheel. De vorm van de bladeren verandert daardoor van vijflobbig in bijna rond. De bladrand is vaak naar beneden omgebogen, zodat het blad enigszins de vorm van een lepel krijgt. Ook komt het voor, dat de bladeren in de middennerf bijna dubbelvouwen zodat zij dakvormig worden (fig. 1a). Het oppervlak van deze ernstig misvormde bladeren is meestal sterk gereduceerd. Naast struiken met genoemde ernstige symptomen vindt men ook struiken met veel zwakkere ziekteverschijnselen, waarbij het aantal tanden in de bladrand maar weinig kleiner is en de insnijdingen tussen de bladlobben slechts iets minder diep zijn dan bij gezonde planten (fig. 1b). Planten met dergelijke zwakke symptomen zijn soms moeilijk van gezonde planten te onderscheiden (fig. 1c). Tussen deze twee uiterste vormen van lepelblad komen talrijke overgangen voor, doch men treft deze in het algemeen niet bij één plant aan. Veeleer vindt men aan verschillende struiken verschillende vormen van lepelblad. Hieruit zou men kunnen afleiden, dat er verschillende stammen van lepelblad voorkomen, wat ook verder in dit artikel nog ter sprake komt. De groeikracht van lepelbladzieke struiken gaat soms vrij sterk achteruit, vooral wanneer het struiken betreft met ernstige symptomen, doch een nauwkeurige vergelijking van aangetaste struiken met gezonde buurstruiken is in de Bangertse tuinen onmogelijk, omdat de leeftijd van de bessestruiken in een tuin sterk uiteenloopt. Slechts in één geval te Wemeldinge (Zld), waar enkele lepelbladzieke struiken met zwakke symptomen

werden gevonden in een uniforme aanplant van ongeveer vijf jaar oud, was vergelijking mogelijk. Aan deze struiken, die waarschijnlijk ziek geplant waren, kon geen groeivermindering en ook geen opbrengstreductie worden vastgesteld. Volgens sommige tuinders in „de Bangert" zouden de stelen der vruchttrossen van zieke planten dikker worden en de bessen kleiner blijven. Waarnemingen hieromtrent hebben deze mening nog niet overtuigend kunnen bevestigen.

Overbrengingsproeven

1. *Entproeven*

In juli 1957 werd een aantal rode en zwarte bessen geënt met materiaal van lepelbladzieke struiken van verschillende herkomst. Bij twee der geënte rodebessestruiken behorend tot de rassen Fay's Prolific en Laxton's Perfection werd in april 1958 een bontheid op de bladeren van het overjarige hout waargenomen. Deze bontheid kwam verspreid over de tweejarige struiken voor, echter met uitzondering van de takken waarop in 1957 de zieke enten werden geplaatst. Aan de jonge scheuten, die in de loop van het groeiseizoen op deze geënte takken ontstonden, werden eind mei de eerste symptomen van lepelblad waargenomen. Aan het eind van de groeiperiode vertoonden ook de op de andere takken ontstane jonge scheuten lepelbladsymptomen. Beide planten waren geënt met takken van dezelfde zieke struik, die afkomstig was uit een tuin te Blokker. De vier overige struiken, behorend tot dezelfde rassen, welke geënt waren met materiaal van andere zieke struiken, werden niet duidelijk bont, maar vertoonden wel aan het eind van het jaar typische lepelbladsymptomen. In de zomer van 1959 werd aan geen dezer geënte rode bessen meer bontheid waargenomen. Van de vier geënte zwarte bessestruiken, behorend tot vier verschillende rassen, vertoonde die van het ras Baldwin (type Hilltop) in april 1958 aan een dicht bij de entplaats gegroeide jonge scheut in enkele bladeren een bontheid. Deze bestond in een uit witte vlekjes opgebouwd lijnenpatroon, op enige afstand van de bladrand (fig. 2). Het overige gedeelte van de struik vertoonde geen afwijking. In mei 1959 werd deze bontheid weer waargenomen en wel in drie scheuten, die gegroeid waren op de in 1957 geënte tak. De andere takken van de struik hadden ook nu nog geen symptomen. Een geënte plant van het ras Cotswold Cross vertoonde in mei 1959 deze bontheid eveneens. Ook bij deze plant bleef het verschijnsel beperkt tot de onderste bladeren van enkele in de buurt van de entplaats ontstane jonge scheuten. Alle zwarte bessen waren geënt met materiaal van dezelfde lepelbladzieke struik, afkomstig uit Wemeldinge.

2. *Sapinoculaties*

a. Overdracht van bessen op kruidachtige planten

Eind mei 1958 werden op *Nicotiana rustica*, *N. tabacum* var. White Burley en *Chenopodium amaranticolor* sapinoculaties verricht met sap van één der bonte rode bessen uit de bovengenoemde entproeven. Na ongeveer 12 dagen verschenen op de geïnoculeerde bladeren van *N. rustica* loodgrijze kringetjes ter grootte van 2 mm, die later necrotisch werden en in elkaar overgingen. Ongeveer drie weken na de inoculatie werden spreidsymptomen waargenomen in de vorm van gele en licht groene kringetjes met een middellijn van 1 cm. Een aantal van deze kringen werd later necrotisch. *N. tabacum* vertoonde 12 dagen na de inoculatie op de geïnoculeerde bladeren enkele necrotische kringen met een doorsnede van

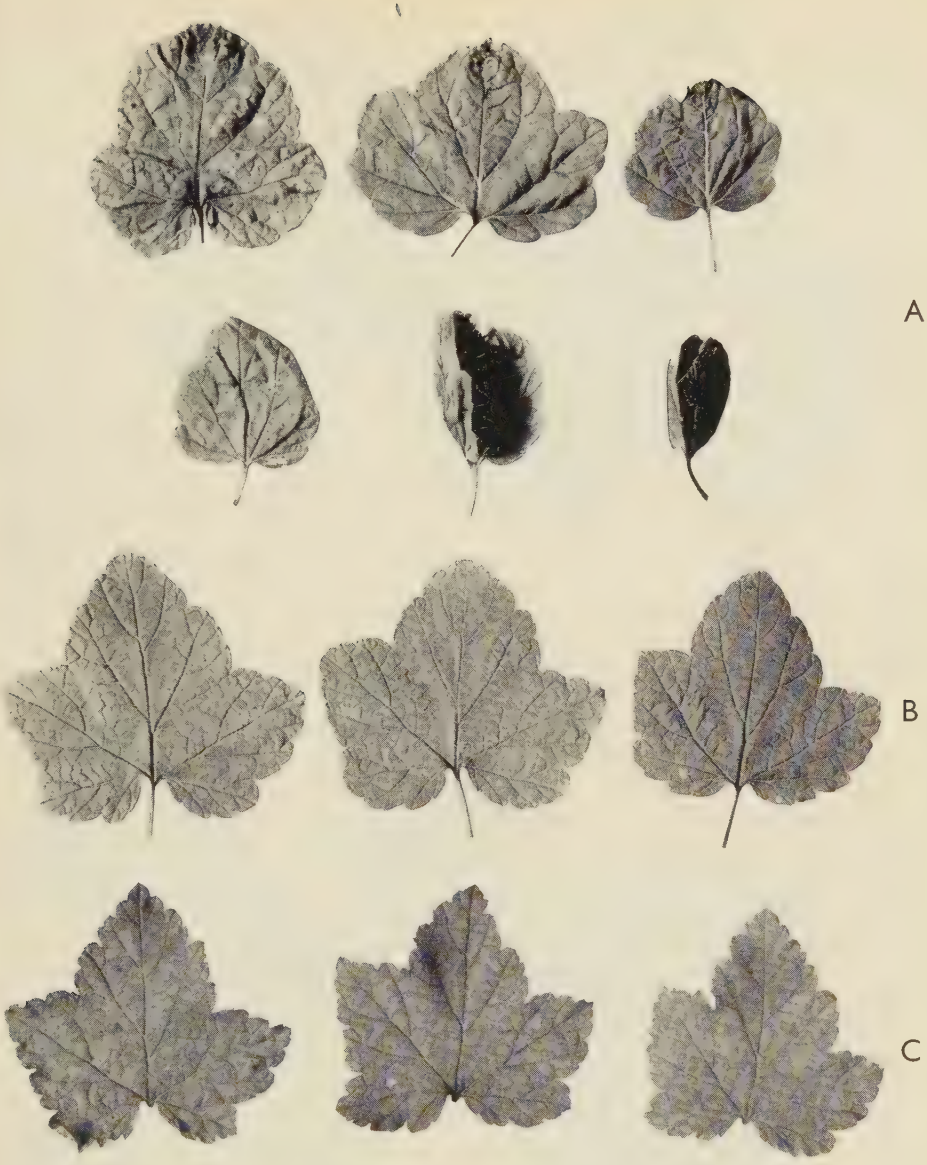


FIG. 1. Bladeren van eenjarige scheuten van het ras Fay's Prolific,
A Ernstige lepelbladsymptomen
B Zwakke lepelbladsymptomen
C Bladeren van een gezonde struik

Leaves of vegetative shoots of the red currant variety Fay's Prolific,
A *Severe symptoms of spoon leaf*
B *Mild symptoms of spoon leaf*
C *Leaves of a healthy bush*

FIG. 9. Bladeren van eenjarige scheuten van het ras Fay's Prolific.
A Grote helder gele kringen.
B Onregelmatige gele lijnen.
C Met de nervatuur samenhangende lijnpatronen.
Deze drie afwijkende vormen van bontheid werden slechts bij enkele struiken waargenomen doch houden waarschijnlijk ook verband met lepelblad en wel als eerste symptoom er van.
D Gele banden langs de nerven, werd alleen gevonden bij een aantal struiken die geheel lepelbladziek waren, en geen enkele maal bij lepelbladvrije struiken. De bladeren die deze bontheid vertoonden waren dan ook meestal zelf reeds min of meer duidelijk lepelvormig, dit in tegenstelling tot bladeren die andere vormen van bontheid vertonen.

Leaves of vegetative shoots of the red currant variety Fay's Prolific.
A *Vivid yellow rings.*
B *Irregular yellow lines.*
C *Yellow lines following the veins.*
These three forms of mosaic were found only on some bushes but probably they are also connected with spoon leaf, being a first symptom of it.
D *Yellow bands along the veins, only found on some spoon leaf-diseased bushes and not on healthy plants. The leaves showing this type of mosaic were therefore mostly spoon shaped. Leaves showing the other types of mosaic were not spoon shaped.*

ongeveer 12 mm. Bij deze soort werden geen spreidsymptomen waargenomen. De geïnoculeerde bladeren van *C. amaranticolor* reageerden na drie weken met rode kringetjes ter grootte van ongeveer 3 mm. Deze plant vertoonde evenmin spreidsymptomen. Er werden ook inoculatieproeven gedaan met sap uit de bonte bladeren van de bij de entproeven vermelde zwarte bes. Hiermee werden alleen symptomen verkregen op *N. rustica*, eveneens in de vorm van grijze kringetjes. In dit geval werden de kringen echter niet necrotisch en er ontstonden evenmin spreidsymptomen. Er bestond dus een duidelijk verschil tussen de beide verkregen virusisolaties (fig. 3). Dit verschil bleef ook na herhaald overbrengen van tabak op tabak duidelijk waarneembaar. In de loop van 1958 werden voorts virusisolaties verkregen uit nog negen andere lepelbladzieke struiken, afkomstig van vier verschillende Bangertse bedrijven. Sapinoculatie op tabak met materiaal van 13 lepelbladvrije struiken van dezelfde bedrijven gaf in geen enkel geval een positief resultaat. Evenals de beide eerste isolaties gaven ook de latere isolaties soms vrij sterke onderlinge verschillen te zien. Hoewel ook de symptomen van één isolatie gedurende de verschillende passages op tabak soms vrij sterk variëerden, kwamen toch bij verschillende isolaties steeds dezelfde typische eigenschappen naar voren. De verschillende kruidachtige planten, waarop het virus kon worden overgebracht, gaven symptomen die hieronder zullen worden beschreven.

Nicotiana tabacum var. White Burley

Op de geïnoculeerde bladeren verschenen een week na de inoculatie gele vlekken van ongeveer 4 mm grootte. Bij sommige virusisolaties werden deze vlekken necrotisch, bij andere verdwenen zij op de duur en werden de geïnoculeerde bladeren bij het ouder worden der planten egaal geel. Soms vertoonden deze lokale lesies een duidelijke kringvorm. Bij één isolatie werden als lokale symptomen fraaie concentrische ringen verkregen, die niet necrotisch werden (fig. 4). In enkele proeven ontstonden op de geïnoculeerde bladeren grote enkelvoudige necrotische kringen met een middellijn van 10 tot 12 mm; dezelfde isolaties gaven in andere proeven veel kleinere kringen en vlekken te zien. Mogelijk hield dit verband met de leeftijd der geïnoculeerde planten. Spreidsymptomen werden vooral verkregen met die isolaties die ook heftige lokale symptomen veroorzaakten. Deze bestonden soms uit zigzaglijnen langs de nerven, soms uit necrotische kringvlekken en vaak uit enkele grote concentrische kringpatronen. In verscheidene proeven met zwakke isolaties werden op White Burley in het geheel geen symptomen verkregen. In het algemeen waren de reacties gedurende de wintermaanden heftiger dan in de zomermaanden.

Nicotiana rustica

Ongeveer acht dagen na de inoculatie ontstonden op de geïnoculeerde bladeren loodgrijze kringetjes met een doorsnede van 2 tot 3 mm. Bij enkele isolaties ging dit gepaard met heftige necrose; andere gaven in het geheel geen necrose te zien. Spreidsymptomen verschenen meestal 14 tot 16 dagen na de inoculatie en wel in de vorm van gele en lichtgroene kringen ter grootte van ongeveer 10 mm. Wanneer lokale necrose optrad dan werd deze in de meeste gevallen later systemisch. In deze gevallen was de groei dikwijls sterk geremd. De planten gingen echter nooit geheel te gronde en meestal volgde vier tot zes weken na de inoculaties enig herstel.

Tomaat

Lokale symptomen, bestaande uit vage, gele vlekken, werden 10 tot 14 dagen na de inoculatie zichtbaar. Daarna trad systemische necrose op, veelal gepaard gaande met heftige bladmisvorming (fig. 5). Sommige isolaties brachten spreidsymptomen teweeg in de vorm van concentrische kringetjes. Oudere planten vertoonden dikwijls een grijsachtige tot gele chlorose in de top, die sterk deed denken aan spintaantasting. Deze beschrijving geldt alleen voor de in de wintermaanden uitgevoerde inoculatieproeven, in de zomermaanden werden veel minder duidelijke symptomen verkregen.

Komkommer

Een in juni 1958 uitgevoerde inoculatieproef op komkommer leverde geen enkel ziekteverschijnsel op. In november werd de proef herhaald met negen verschillende isolaties. Bij alle isolaties werden toen op de geïnoculeerde bladeren kleine gele vlekjes verkregen. Vier van de negen isolaties gaven bovendien spreidsymptomen in de vorm van een vaag mozaïek.

Chenopodium amaranticolor

Op de bladeren verschenen ongeveer 14 dagen na het inoculeren bruinrode vlekjes met een doorsnede van 2 tot 3 mm. Er werden geen spreidsymptomen waargenomen. Pogingen om het virus van *Chenopodium* over te brengen op andere planten gelukten niet.

Callistephus chinensis

Deze plant reageerde op inoculatie niet met lokale symptomen. In een in juli 1958 genomen proef werden op een paar niet geïnoculeerde bladeren van enkele planten zigzaglijnen langs de nerven verkregen, die tezamen een min of meer volledig eikebladpatroon vormden. Bij inoculatie van aster in december 1958 werden spreidsymptomen verkregen: kleine, heldere, gele vlekjes, grotere, vaag gele vlekken en soms vergeling van grote aaneengesloten bladgedeelten (fig. 6).

Beta vulgaris

Van negen verschillende isolaties gaven er slechts twee symptomen op suikerbiet. Deze bestonden uit lichtgroene kringvlekjes ter grootte van ongeveer 4 mm op de geïnoculeerde bladeren en een vaag mozaïek, dat samenging met enige bladmisvorming op de na de inoculatie ontstane bladeren.

Infectieproeven op *Phaseolus vulgaris*, *Vicia faba* en verschillende erwterassen leverden geen symptomen op.

b. Overdracht van kruidachtige planten op bes

Gedurende de maanden maart en april werd getracht de verschillende van bes verkregen virusisolaties van tomaat terug te brengen op bes. Hiervoor werden jonge bessezaailingen gebruikt, die vier of vijf bladeren hadden. In geen enkel geval kon virusoverdracht worden vastgesteld. Op 21 april werd een inoculatieproef uitgevoerd met sap van *Nicotiana rustica* op 16 bessezaailingen van het ras Fay's Prolific. In deze proef werd wel virusoverdracht verkregen. Na 16 dagen was nl. bij één der geïnoculeerde planten op één der jongste bladeren een duidelijk mozaïek waar te nemen. Na 18 dagen vertoonden nog twee zaailingen

dezelfde verschijnselen. Aan deze twee laatste planten ontstonden nog enkele bonte bladeren, waarna verdere bladvorming achterwege bleef. De eerstgenoemde plant groeide wat langer door en vormde achtereenvolgens vijf bonte bladeren, drie normale, groene bladeren zonder vormafwijking en tenslotte een vijftal bladeren met onmiskenbare lepelbladsymptomen (fig. 7). De bontheid op de vijf vermelde bladeren bestond uit lichtgele vlekken afgewisseld met een gele verkleuring van grote bladgedeelten. Deze geelkleuring van grote bladgedeelten veroorzaakte soms een plaatselijke groeiremming in het blad, waardoor de bladhelften ongelijk van grootte werden. Het is opmerkelijk, dat ook in de proeven met sapinoculatie de lepelbladsymptomen voorafgegaan werden door een bontheid, die later weer verdween. Het lag dus voor de hand om ook in praktijkaanplantingen te speuren naar een eventueel met lepelblad verband houdende bontheid.

Veldwaarnemingen[1]

1. *Bontheid in verband met lepelblad*

Op 20 mei 1959 werden zes Bangertse bedrijven bezocht. Op elk daarvan werden verscheidene struiken gevonden met een bontheid, die sterk deed denken aan de symptomen welke in de sapinoculatieproef op bessezaailingen werden verkregen. De planten vertoonden alleen bontheid in de bladeren van de jonge kruidachtige scheuten. In geen enkel geval werd echter in praktijkaanplantingen bontheid van het blad aan de overjarige takken waargenomen, zoals die in de beschreven entproeven werd verkregen. Op één bedrijf, waar op 2 juni 1954 120 bonte struiken aanwezig waren werden uitvoerige waarnemingen verricht. Van de 2724 struiken van dat bedrijf werden er 1026 aangemerkt als lepelbladziek. Deze lepelbladstruiken vertoonden geen bontheid. Van de 120 bonte struiken hadden er 48 alleen bontheid; de overige 72 gaven in een gedeelte der takken reeds lepelblad te zien. De bontheid werd hierbij zonder uitzondering alleen gevonden in die takken, die nog geen lepelblad vertoonden. In geheel lepelbladzieke struiken werd nooit bontheid waargenomen. Op 8 juli had een aantal van de op 2 juni gemerkte bonte planten in de top van de bonte scheuten duidelijk lepelbladsymptomen (fig. 8). Het betrof hier in de meeste gevallen goed groeiende scheuten, die een groot aantal bladeren vormden, waarvan de onderste reeds bont waren. Minder goed groeiende scheuten of scheuten, waarvan de bonte bladeren hoger geplaatst waren, vertoonden geen of onduidelijk lepelblad in de top. Aangezien op 8 juli de lengtegroei der jonge scheuten vrijwel voltooid was konden deze zomer geen verdere waarnemingen gedaan worden. Het beeld van die jonge bonte scheuten komt vrij goed overeen met de in de sapinoculatieproeven verkregen symptoomontwikkeling. Ook in de praktijk blijkt lepelblad dus voorafgegaan te worden door een bontheid van de bladeren. Door middel van waarnemingen in gekarteerde aanplantingen zal worden onderzocht of dit bij iedere nieuwe infectie het geval is. De bontheid was niet altijd zo duidelijk als in fig. 8 te zien is en bleef bij sommige struiken beperkt tot enkele kleine, lichtgele vlekken op slechts enkele bladeren. Soms werden lijnenpatronen gevonden, die met de nervatuur samenvielen (fig. 9c); een andere maal verliepen deze lijnenpatronen veel grilliger (fig. 9b). Bij verscheidene struiken werden

[1] Bij deze veldwaarnemingen werd zeer veel medewerking verkregen van de heer J. Jong, assistent van het Rijkstuinbouwconsulentschap Hoorn, waarvoor onze hartelijke dank.

duidelijke kringen waargenomen op de bladeren, soms met ovalen langs de nerven (fig. 9a). Ook werden gedeeltelijk lepelbladzieke struiken gevonden, die geen bontheid vertoonden. Een andere, mogelijk ook met lepelblad verband houdende bontheid wordt gevormd door kleine vlekjes gerangschikt in banden langs de nerven, zg. veinbanding (fig. 9d). Deze bontheid werd namelijk tot nu toe alleen gevonden bij 18 lepelbladzieke struiken. Bij gezonde planten en ook bij het overgrote deel der onderzochte lepelbladzieke struiken werd deze bontheid niet waargenomen.

2. *Verspreiding van lepelblad in praktijkaanplantingen*

Uit veldwaarnemingen blijkt, dat verspreiding van lepelblad in de Bangertse tuinen vaak plaats heeft door het gebruik van ziek plantgoed. Vele tuinders winnen namelijk jonge struiken uit stekken van hun eigen bedrijf. Het stekken en het uitplanten van de jonge, meestal tweejarige, struiken geschiedt in de winter als de bessen kaal zijn en er dus geen symptomen zichtbaar zijn. Dit en een soms onvoldoende kennis van de dikwijls onduidelijke symptomen belemmeren het uitroeien van de ziekte door selectie.

Beschouwen we echter de eerder beschreven bontheid als een eerste symptoom van lepelblad, dan blijkt er naast verspreiding door ziek plantgoed ook verspreiding door nieuwe infecties plaats te vinden. Op welke wijze deze infecties tot stand komen is nog niet duidelijk. In de bovengenoemde bessenaanplant van 2724 struiken, die geheel in kaart werd gebracht, is een sterke haardvorming te constateren. Dit zou kunnen duiden op een mogelijke ongevleugelde, zich langzaam verplaatsende, overbrenger, of op een via de grond plaatshebbende infectie, al of niet door een in die grond levend organisme. Ook is het denkbaar dat het virus door wortelcontact overgaat. Proeven met bessezaailingen in grond, verzameld rondom zieke struiken, hebben tot nog toe geen positief resultaat opgeleverd.

3. *Gevoeligheid van verschillende rassen*

Hierover zijn nog weinig gegevens bekend, omdat in de oude Bangertse tuinen vrijwel uitsluitend het ras Fay's Prolific geteeld wordt. Dit ras verdraagt een vrij dichte beschaduwing zeer goed en is dus voor de Bangertse teelt bijzonder geschikt. Versailles Rouge, een ras dat in vele oude tuinen vermengd met Fay's Prolific voorkomt en dat van dit ras alleen is te onderscheiden door de lichtere kleur van de bloembodem, is eveneens zeer vatbaar. Op een oud bedrijf te Schellinkhout werden twee door lepelblad aangetaste struiken waargenomen van het ras Jonkheer van Tets. Van de overige rode besserassen zijn schrijver geen gegevens bekend. Wel werden in entproeven ook op het ras Laxton's Perfection lepelbladsymptomen verkregen.

4. *Waarnemingen betreffende zwarte bes en kruisbes*

Zoals op blz. 14 werd vermeld kon het virus uit een lepelbladzieke rode bes door middel van enting op zwarte bes worden overgebracht. Het blijkt zich in deze proeven slechts langzaam door de gehele struik te verspreiden. In verscheidene Bangertse tuinen vindt men zwarte bessen, verspreid tussen de rode bessen. Op deze zwarte bessen werden nimmer verschijnselen gevonden, die ook maar enigszins geleken op de bij de entproeven verkregen symptomen.

Op vele oude Bangertse bedrijven kweekt men tussen de rode bessen vrij veel

kruisbessen. Op één bedrijf werden aan enkele dezer struiken afwijkingen gevonden, waarbij o.a. de vruchten slecht afrijpten en een onregelmatige vorm kregen. Deze afwijking is vrij uitvoerig beschreven door HOUTMAN (1951). Uit één van deze struiken werd een virus geïsoleerd, dat zeer veel overeenkomst vertoont met de van lepelbladzieke rode bessen verkregen virusisolaties. Dit virus kon niet worden verkregen uit gezonde struiken en evenmin uit kruisbessestruiken met andere afwijkingen. Het is nog niet gelukt om het virus door middel van sapinoculatie weer op kruisbes terug te brengen.

DISCUSSIE

Uit proeven blijkt dat het virus, dat het lepelblad bij rode bes veroorzaakt, door middel van sapinoculatie kan worden overgebracht op tabak en van daaruit weer op bes. Het feit dat met sap van lepelbladvrije struiken nimmer kringvlekken werden verkregen op tabak, maakt het zeer waarschijnlijk dat de op tabak verkregen kringvlekken ook inderdaad teweeggebracht worden door hetzelfde virus, dat op rode bes lepelblad veroorzaakt. Er werden geen aanwijzingen verkregen, dat twee viruscomponenten in het spel zijn, waarvan de één bontheid en de ander lepelblad in rode bes doet ontstaan. Mochten we deze veronderstelling niettemin wel willen maken, dan moeten we, gezien de proefresultaten, aannemen, dat de component, die op rode bes bont veroorzaakt, latent in tabak aanwezig kan zijn, op rode bes alleen bij gelijktijdige infectie met lepelblad zichtbaar is en enige tijd na de infectie weer verdwijnt. Of ook in gezonde planten de component bont latent aanwezig kan zijn of steeds aanwezig is, ofwel dat de twee virussen alleen gezamenlijk infectie kunnen veroorzaken, blijft dan een open vraag. Bij de laatste zienswijze zijn we weer dicht genaderd tot de opvatting van één virus. Schrijver is derhalve van mening, dat de beschreven bontheid een primair symptoom is van lepelblad, dat later, bij het verschijnen van de werkelijke lepelbladsymptomen, weer verdwijnt. Of deze bontheid steeds aan lepelblad voorafgaat is niet zeker, daar bij de entproeven niet alle planten eerst bont werden, en er ook bij veldwaarnemingen struiken werden gevonden, die in sommige takken lepelblad vertoonden, doch waarvan de overige takken niet bont waren. Dit al of niet samengaan van lepelblad met bontheid zou verklaard kunnen worden door aan te nemen dat er verschillende virusstammen in het spel zijn. Hiervoor pleiten eveneens de resultaten der sapisolatieproeven en de verschillen in hevigheid der lepelblad symptomen. De bij verschillende lepelbladzieke struiken waargenomen „veinbanding" zou in dit zelfde licht kunnen worden bezien. Het is echter ook mogelijk, dat het al of niet optreden van bontheid afhankelijk is van andere omstandigheden, zoals groeivoorwaarden, leeftijd van de struik en tijdstip van infectie. Wat dit laatste betreft is het opmerkelijk, dat in de entproeven, waarbij de infectie in juli plaats vond, bontheid alléén werd verkregen op de bladeren van het overjarige hout; in het veld, bij op natuurlijke wijze geïnfecteerde planten, werd bontheid slechts gevonden bij de bladeren der jonge scheuten, een categorie van bladeren die pas later in het groeiseizoen wordt gevormd. Oppervlakkig gezien wijst dit er op, dat de natuurlijke infectie na juli en misschien zelfs in het daaropvolgende vroege voorjaar heeft plaats gehad (de incubatietijd bij de sapinoculatieproeven op bes bedroeg nl. slechts 16 dagen). Het is echter ook zeer goed mogelijk dat de natuurlijke infectie een andere reactie teweegbrengt en een langere incubatietijd

behoeft dan kunstmatige infectie. Zo is bv. uit het onderzoek van FULTON (1940) bekend, dat bij verschillende virussen een ondergrondse infectie via de wortels een geheel ander verloop heeft dan een bovengrondse infectie.

VAN POETEREN (1926) wijst er op dat lepelblad bij rode bes veel overeenkomst vertoont met brandnetelblad of „reversion" van zwarte bes, een viruszieke die o.a. door LEES (1920) en AMOS & HATTON (1926) uitvoerig beschreven werd en die ook in Nederland algemeen bij zwarte bessen voorkomt. Er is inderdaad een zekere gelijkenis, o.a. wat betreft de reductie van het aantal nerven en van het aantal tanden in de bladrand. Uit ons onderzoek bleek echter duidelijk, dat lepelblad en brandnetelblad door twee verschillende virussen veroorzaakt worden. Door enting met materiaal van lepelbladzieke rode bes werd op zwarte bes nl. alleen een bontheid verkregen en geen brandnetelblad. Bovendien kon uit een dergelijke geënte zwarte bes weer kringvlekkenvirus worden geïsoleerd. Inoculatieproeven met sap van brandnetelbladzieke en van gezonde zwarte bessen op tabak gaven daarentegen in geen enkel geval symptomen.

Over de identiteit van het uit lepelbladzieke struiken verkregen virus kan nog niets positief vermeld worden. De symptomen op verschillende waardplanten, vooral op *N. rustica* en op tabak, gelijken veel op die van een virus, dat door HILDEBRAND uit rode bessen werd geïsoleerd (HILDEBRAND, 1942). Als enig symptoom op bes vermeldt HILDEBRAND „zonate chlorotic spots" op enkele planten, die in een kas bij een temperatuur van 70° tot 80° groeiden en die tevens met „currant mosaic" (HILDEBRAND, 1939) waren geïnfecteerd. Deze symptomen, waarvan HILDEBRAND (1942) ook een foto geeft, doen sterk denken aan de door ons in de entproeven verkregen bontheid op de bladeren van het vruchthout. Op buiten groeiende planten nam HILDEBRAND nooit een dergelijke bontheid waar. Uit het feit, dat het virus niet uit alle met currant mosaic geïnfecteerde planten kon worden geïsoleerd leidt HILDEBRAND af dat currant mosaic en het door hem op tabak geïsoleerde virus twee verschillende virussen zijn, doch het gelukte hem niet om op tabak een virus te isoleren uit struiken, die niet met currant mosaic geïnfecteerd waren (HILDEBRAND, 1941 en 1944). Hij slaagde er evenmin in het virus door middel van sap terug te brengen op bes en komt voorts door vergelijkende waardplantenproeven tot de conclusie, dat zijn virus vrijwel identiek is met het tomato ringpot virus (HOLMES, 1939). KLESSER (1951), die eveneens een kringvlekkenvirus isoleerde uit rode bessen, en wel uit van oorsprong Nederlandse struiken, vereenzelvigt al of niet opzettelijk in haar „introduction" het door HILDEBRAND beschreven kringvlekkenvirus met diens currant mosaic. Zij komt door vergelijking met andere kringvlekkenvirussen tot de conclusie, dat het door haar gevonden virus een ander is dan de tot dan toe beschreven kringvlekkenvirussen. Ook de symptomen die KLESSER verkrijgt, o.a. op tabak en tomaat, vertonen een vrij sterke gelijkenis met de door ons verkregen symptomen op deze waardplanten. Er zijn echter ook duidelijke verschillen aan te wijzen. Zo verkrijgt KLESSER op *N. rustica* geen lokale symptomen. Op *N. rustica* neemt zij dezelfde spreidsymptomen waar als op *N. tabacum* en zij vermeldt van tomaat geen necrose en chlorose als spreidsymptoom. De door haar beschreven verschijnselen op „naturally infected plants" komen vrij goed overeen met de door ons waargenomen, aan lepelblad voorafgaande, bontheid. KLESSER slaagde er in het virus van tabak door middel van sapinoculatie terug te brengen op bes, echter alleen wanneer zij werkte met jonge in een kas groeiende zaailingen. Hoewel de gepubliceerde foto van één

dezer zaailingen vrij onduidelijk is, komt de beschrijving der symptomen goed overeen met de door ons in sapinoculatieproeven op bes verkregen verschijnselen. Ook wat betreft het later weer verdwijnen van de symptomen is er overeenstemming. KLESSER vermeldt evenmin als HILDEBRAND iets over lepelbladsymptomen. In zijn laatste publikatie, waarin hij de resultaten vermeldt van entproeven betreffende de gevoeligheid van een aantal besserassen voor currant mosaic, vermeldt HILDEBRAND (1944) echter „a peculiar crinkle symptom" voor verschillende rassen. Ofschoon deze korte aanduiding moeilijk te beoordelen is, doet zij enigszins denken aan de ernstigste vorm van lepelblad.

Hoewel uit het voorgaande blijkt, dat er een zekere overeenkomst bestaat tussen de door KLESSER en HILDEBRAND beschreven virussen en het door ons geïsoleerde virus is het nog te vroeg om een definitief oordeel te geven betreffende verwantschap van deze virussen. Hiertoe is verder, indien mogelijk, vergelijkend onderzoek nodig, bv. langs serologische en elektronenmicroscopische weg. Hetzelfde geldt voor een mogelijke verwantschap tussen deze uit bes geïsoleerde virussen en enkele andere recent beschreven virussen, die eveneens op tabak kringvlekken veroorzaken. Dergelijke virussen werden onder meer uit framboos (CADMAN, 1956) en uit kers (KUNZE, 1958; PFAELTZER, 1959) geïsoleerd.

SAMENVATTING

In het fruitteeltgebied „de Bangert" komt al sinds 1920 bij rode bessen een virusziekte voor, die bekend is onder de naam „lepelblad". Lepelbladzieke struiken worden gekenmerkt door bladmisvormingen, waarbij de insnijdingen tussen de bladlobben soms vrijwel verdwijnen en het aantal tanden in de bladrand sterk vermindert. De bladrand is bovendien veelal naar beneden omgebogen, waardoor het blad de vorm krijgt van een omgekeerde lepel. Lepelblad kan door enten worden overgebracht van zieke op gezonde rode bessen. Op zwarte bes, geënt met materiaal van lepelbladzieke rode bes, werd in enkele gevallen een bontheid verkregen doch geen lepelblad. Uit de beschreven proeven blijkt, dat lepelblad van rode bes en brandnetelblad van zwarte bes – hoewel er een zekere overeenkomst bestaat tussen de symptomen – veroorzaakt worden door twee geheel verschillende virussen. Uit lepelbladzieke struiken werd door middel van sapinoculatie een virus geïsoleerd, dat op tabak kringvlekken veroorzaakt. Inoculaties met sap uit lepelbladvrije struiken had nooit een dergelijke reactie ten gevolge. Met sap van kringvlekken vertonende tabak kon op bes weer lepelblad worden teweeggebracht.

Zowel bij sommige geënte struiken als in de sapinoculatieproef werd lepelblad voorafgegaan door een bontheid, die na het verschijnen van de lepelbladsymptomen weer verdween. Uit veldwaarnemingen bleek, dat ook bij natuurlijke infectie deze bontheid vaak voorafgaat aan lepelblad. Aangenomen wordt, dat genoemde bontheid een primair symptoom is van lepelblad en dat beide door hetzelfde virus worden veroorzaakt. In verschillende gevallen kon worden vastgesteld, dat lepelblad verspreid wordt door gebruik van ziek plantmateriaal. Aannemende dat de beschreven bontheid een eerste symptoom is van lepelblad, kunnen wij echter aan de hand van het voorkomen van die bontheid in besseaanplanten vaststellen, dat er ook verspreiding plaats heeft door het optreden van nieuwe infecties. In een geheel in kaart gebrachte aanplant werd een duidelijke haardvorming geconstateerd, hetgeen zou kunnen wijzen op een zich

langzaam binnen de aanplant verspreidende, mogelijk ongevleugelde overbrenger. In proeven met planten in besmette grond werd nog geen infectie verkregen.

Het op tabak geïsoleerde virus vertoont in sommige opzichten een vrij sterke gelijkenis met door HILDEBRAND (1942) en KLESSER (1951) uit rode bes geïsoleerde virussen. Er is echter nog niet genoeg vergelijkend onderzoek verricht om onze isolaties en die van genoemde onderzoekers als identiek te beschouwen. Ook een eventuele verwantschap met andere recent beschreven virussen, die op tabak kringvlekken veroorzaken en die o.m. werden geïsoleerd uit framboos (CADMAN, 1957) en kers (KUNZE, 1958; PFAELTZER, 1959) dient nader te worden onderzocht.

SUMMARY

Spoon leaf is a virus disease in red currants which occurs abundantly in the old fruit-growing centre of "De Bangert" in the province of North-Holland, and is practically restricted to this area. Although the type of soil in "De Bangert" varies considerably within short distances, light clay soils are predominant.

The disease was first described by MAARSE (1926) and by VAN POETEREN (1926).

A characteristic symptom is leaf deformation, the leaves sometimes being almost round, with no teeth in the margin which itself is often curled downward in a spoonlike fashion. VAN POETEREN (1926) mentions the fact that the symptoms of spoon leaf in red currants resemble to some extent those of "reversion" in black currants. Our experiments, however, show clearly that these diseases are caused by different viruses.

By means of sap inoculation a virus of the ring spot type could be transmitted from spoon leaf diseased red currants to tobacco and other herbaceous hosts. In one of the experiments the virus could be brought back into currant by sap inoculation. In some grafted plants, as well as in the sap inoculation experiment, the spoon leaf symptoms were preceded by a mosaic which disappeared when the spoon leaf symptoms developed. Also in naturally infected plants, mosaic is often found before the spoon leaves appear. It seems likely that the mosaic is a primary symptom of spoon leaf, and that both symptoms are caused by the same virus. In some plantations it was observed that the virus was distributed by the use of diseased plant material. However, considering the described mosaic as a primary symptom of spoon leaf, it is clear that in the "De Bangert" area new infections also take place. A mapped plantation, containing 2500 red currant bushes, showed an accumulation of diseased plants which might be attributed to a slowly spreading wingless vector. Results of experiments with red currant seedlings in soil from the vicinity of diseased plants, did not yet prove soil transmission of the virus. The symptoms of the red currant virus in tobacco show similarity to those caused by viruses which were isolated from red currant by HILDEBRAND (1942) and KLESSER (1953). However, more comparative research is needed to conclude that those viruses are identical with the virus causing spoon leaf. It is not yet possible either to answer the question whether there is any relationship between these currant viruses and other recently described viruses, such as those isolated from raspberry (CADMAN, 1957) and from cherry (KUNZE, 1958; PFAELTZER, 1959).

Literatuur

Amos, J. & R. G. Hatton, – 1927. Reversion in black currants. I. Symptoms and diagnosis of the disease. J. Pomol. and hort. Sci. 6: 167–183.

Cadman, C. H., – 1951. Studies in Rubus virus diseases. I. A latent virus of Norfolk Giant raspberry. Ann. appl. Biol. 38: 801–811.

Cadman, C. H., – 1956. Studies on the etiology and mode of spread of Scottish raspberry leaf curl disease. J. hort. Sci. 31: 111–118.

Fulton, R. W., – 1941. The behaviour of certain viruses in plant roots. Phytopath. 31: 575–598.

Hildebrand, E. M., – 1939. Currant mosaic. Phytopath. 29: 369–371.

Hildebrand, E. M., – 1941. Mechanical transmission from currant to tobacco of a virus identified as Annulus zonatus. (Abstr.) Phytopath. 31: 11.

Hildebrand, E. M., – 1942. Tomato ringspot on currant. Am. J. Bot. 29: 362–366.

Hildebrand, E. M. & P. V. Weber, – 1944. Varietal susceptibility of currants to the cane blight organism, and to currant mosaic virus. Pl. Dis. Rep. 28: 1031–1035.

Holmes, F. O., – 1939. Handbook of phytopathogenic viruses. Minneapolis.

Houtman, G., – 1951. Het verlopen van kruisbessenstruiken. De Fruitteelt 41: 720–721.

Hus, P., – 1944. Tuinbouwgids 1944. Den Haag.

Ignatius, J. G. W., – 1943. Overzicht van de Nederlandse tuinbouw. Meded. Tuinb. Voorl. Dienst no. 37: 13.

Katwijk, W. van, – 1952. Enkele afwijkingen bij rode en zwarte bessen en kruisbessen. De Fruitteelt 42: 278.

Katwijk, W. van, – 1953. Virusziekten in de vruchtboomkwekerij. Versl. en Meded. Plantenziektenk. Dienst no. 119: 24.

Klesser, P. J., – 1951. A virus disease of red currant. Ann. appl. Biol. 38: 707–713.

Kunze, L., – 1958. Ein Virus der Tabak-Ringflecken-Gruppe von Süsskirschen. Phytopath. Z. 31: 279–288.

Lees, A. H., – 1920. A method of identifying reversion of black currants. A.R. agr. and hort. Res. Sta. Long Ashton 1920: 66.

Maarse, J. (= M. te S.), – 1926. Een nieuwe afwijking in de Fay's Prolific en een raadgeving aan kwekers en telers. Floralia 41: 473.

Pfaeltzer, H. J., – 1959. Onderzoekingen over de rozetziekte van de kers. T. Pl.-ziekten 65: 5–12.

Poeteren, N. van, – 1926. Aalbes. Lepelvormige bladeren. Versl. Plantenziektenk. Dienst over het jaar 1925: 32–33.

Rietsema, I., – 1943. Vijfde beschrijvende rassenlijst voor fruitgewassen Wageningen p. 16.

Sprenger, A. M. – 1948. Leerboek der fruitteelt. Zwolle.

T. Pl.ziekten 66 (1960): 24–26

KORTE MEDEDELING

"ROZETZIEKTE" OF CHERRY, TRANSMITTED FROM HERBACEOUS HOSTS TO CHERRY SEEDLINGS[1]

Met een samenvatting: Rozetziekte van kers, overgebracht van kruidachtige waardplanten op kersen

BY

HILLEGONDA J. PFAELTZER

Instituut voor Plantenziektenkundig Onderzoek, Wageningen

In 1957 and 1958 viruses were transmitted mechanically to cucumber and tobacco plants from cherry trees showing the symptoms of "rozetziekte" (= Pfeffinger disease) (PFAELTZER, 1959). Although there was much variation in the symptoms of herbaceous hosts, caused by different virus isolates, it seemed very likely that these viruses were the cause of the "rozetziekte" of cherry. In order to test this idea attempts were made to infect cherries with virus from tobacco or cucumber plants.

The virus isolates were kept and multiplied in cucumber var. Gele Tros and in tobacco var. White Burley. The cherry seedlings which were used in the tests originated from a healthy mother tree (*Prunus avium* var. Limburgse boskriek). The seedlings were grown in pots in the glasshouse. At the end of the summer the pots were placed out of doors.

The inoculum, consisting of sap from the leaves of infected cucumber and tobacco plants respectively, was sometimes partially clarified by centrifugation.

Different methods of inoculation were used: these included rubbing the young leaves with sap and carborundum powder, injecting sap into the stem, or placing a piece of the herbaceous host plant under a slip of the bark of a seedling. The results of the inoculation experiments are summarised in table 1.

The symptoms (fig. 1 and 2) which developed in the inoculated cherry seedlings were fully comparable to the primary symptoms shown by "rozet"-diseaesed cherries. Secondary symptoms have not yet been observed. On the whole the number of infections was rather low. Inoculations by means of injecting gave fairly good results. Rubbing the leaves of young seedlings with sap and carborundum powder gave a much lower rate of transmission, but had the advantage that the symptoms were visible within a month's time.

From the results it may be concluded that the symptoms in herbaceous hosts are caused by a virus which occurs in "rozet"-diseased cherries.

SAMENVATTING

Zoals reeds eerder werd vermeld (PFAELTZER, 1959) kan uit rozetzieke kersen (Pfeffingerziekte - Eckelraderziekte), een virus worden overgebracht op tabak en komkommer. Thans worden de resultaten meegedeeld van proeven, die beoogden het virus weer in kersen terug te brengen.

[1] Accepted for publication 19 January, 1960.

FIG. 1. Branches of two year old cherry seedlings.
Left: healthy. Right: Showing primary symptoms of "rozetziekte" of cherry after infection by injection with sap from infected tobacco leaves.
Takken van tweejarige kersezaailingen.
Links: gezond. Rechts: met primaire symptomen van rozetziekte van kers na infectie door injectie met perssap van zieke tabaksbladeren.

FIG. 2. Three months old cherry seedling showing primary symptoms of "rozetziekte" of cherry after inoculation by infected cucumber sap.
Drie maanden oude kersezaailing met primaire symptomen van rozetziekte, na inoculatie met geïnfecteerd komkommersap.

TABLE 1. Results of infection experiments on cherry seedlings with a virus which was transmitted from "rozet" diseased cherries to cucumber and tobacco plants.

Resultaten van infectieproeven op kersezaailingen met een virus, dat uit rozetzieke kersen op tabak en komkommer werd overgebracht.

Date of inoculation *Inoculatie datum*	Mode of inoculation *Wijze van inoculeren*	Inoculum *Inoculum*	Date of check *Datum van de controle*	Number of infected plants with regard to number of inoculated plants *Aantal geïnfecteerde planten ten opzichte van aantal geïnoculeerde planten*
Jan. '58	injection (*injectie*)	tobacco sap (*tabakssap*)	April '59	7/7
April '58	carborundum	,,	,,	0/28
Aug. '58	carborundum	,,	,,	0/6
Aug. '58	injection into roots (*injectie in de wortels*)	,,	,,	0/4
Sept. '58	barkgraft (*bastent*)	cucumber leaf [1] (*komkommerblad*)	,,	? 2/17
Sept. '58	barkgraft (*bastent*)	tobacco leaf (*tabaksblad*)	,,	0/9
April '59	carborundum	cucumber sap (*komkommersap*)	May-June '59	11/50
April '59	carborundum	tobacco sap (*tabakssap*)	May '59	0/34

[1] Different parts i.e. from leafblade, petiole or axillary bud.
Verschillende delen nl. van bladschijf, bladsteel of een okselknop.

Zaailingen van een gezonde Limburgse boskriek werden geïnoculeerd met perssap van geïnfecteerde komkommer- of tabaksplanten. De inoculatie werd op verschillende wijzen uitgevoerd: door het inoculum met carborundumpoeder op de jonge bladeren te wrijven; door injectie van het inoculum in de stam; door onder de bast een knop of een stukje blad of bladsteel van de geïnfecteerde kruidachtige planten aan te brengen.

In het voorjaar van 1959 werden aan enkele proefplanten primaire symptomen van de rozetziekte waargenomen (tabel 1). Indien de ontwikkeling van secundaire symptomen volgt, zal dit niet vóór het volgende seizoen zijn.

Inoculatie door middel van injectie heeft de beste resultaten opgeleverd, al was de incubatietijd bijzonder lang. Bij het inoculeren met sap en carborundumpoeder lag het aantal geslaagde infecties vrij laag, doch de symptomen verschenen reeds na ongeveer een maand.

VERENIGINGSNIEUWS

De najaarsvergadering werd gehouden op 12 november te Utrecht.

Dr. G. DANTUMA sprak over: „Enkele resistentie-problemen bij de veredeling van granen in Noord-Amerika". Spreker maakte duidelijk dat in Noord-Amerika, waar de voornaamste doelstelling in de granenveredeling wordt gevormd door verbetering of handhaving van de oogstzekerheid door middel van ziekteresistentie, veel meer aandacht wordt geschonken aan de genetische basis van de resistentie dan in West-Europa. Vooral in de laatste jaren zijn door een onderzoek van Dr. KNOTT in Canada en door het gebruik maken van aneuploïde vormen van tarwe een aantal factoren voor resistentie tegen zwarte roest geanalyseerd, hetgeen van groot belang is voor de praktische veredeling. Geslachtskruisingen met *Aegilops* en *Agropyron* hebben na bestraling waardevolle tarwevormen opgeleverd, die hun resistentie tegen bruine- en zwarte roest hebben verkregen van de wilde vormen. In Mexico wordt gewerkt aan de voltooiing van „multiline varieties", bestaande uit een aantal nagenoeg gelijkvormige lijnen, die beschikken over verschillende resistentiegenen tegen zwarte roest. Voor resistentie tegen de „wheat stem sawfly", die in sommige prairiegebieden grote schade kan aanrichten, speelt de gevuldheid van de tarwestengel met merg een beslissende rol. Te Lethbridge (Z.W. Alberta) wordt met behulp van aneuploïde tarwevormen een onderzoek verricht naar de factoren die de mergvorming in de stengel bevorderen.

Dr. J. DEKKER sprak over: „Onderzoek en toepassing van antibiotica bij de bestrijding van planteziekten". De spreker beperkte zich tot de twee antibiotica, die tot nu toe in de U.S.A. praktische toepassing gevonden hebben, nl. streptomycine en actidione. Streptomycine wordt op ruime schaal met succes toegepast tegen een bacterieziekte op appels en peren, welke „fire blight" genoemd wordt en waarvan *Erwinia amylovora* de veroorzaker is. Dit is een uitermate destructieve en kostbare ziekte die op het vasteland van Europa weliswaar nog niet voorkomt, doch kortgeleden in Engeland reeds aangetroffen is en mogelijk in de toekomst ook de teelt van appels en peren in ons land kan bedreigen. Verder wordt streptomycine door de voorlichting aanbevolen tegen „walnut blight" op walnoten, veroorzaakt door *Xanthomonas juglandis*. In proeven bleek het ook tegen de valse meeldauw bij hop aan de Westkust werkzaam te zijn. Het tweede antibioticum, dat praktische toepassing vindt is cycloheximide (actidione), dat aanbevolen wordt tegen de bladvlekkenziekte op kersen, veroorzaakt door de schimmel *Coccomyces hiemalis* en tegen de zgn. „turf diseases", schimmelziekten van de grasmat. Verdere toepassingen worden belemmerd, doordat dit antibioticum reeds in lage concentraties toxisch is voor vele planten. Er wordt nu gewerkt aan derivaten van actidione, waarvan sommige ook een betere systemische werking hebben en aan toevoeging van stoffen die de toxiciteit verminderen, waarbij opmerkelijke resultaten verkregen worden met een in water oplosbaar chlorophyl-derivaat. Geconcludeerd mag worden dat antibiotica zich een plaats hebben verworven onder de bestrijdingsmiddelen tegen planteziekten in de U.S.A. en het ziet er naar uit dat toepassing tegen andere ziekten dan de hierboven genoemde zal volgen.

Ir. J. A. J. VEENENBOS
Secretaris

BOEKBESPREKINGEN

F. M. BURNETT & W. M. STANLEY, The viruses, biochemical, biological, and biophysical properties. Volume 2. Plant and bacterial viruses. XVI en 408 blz. Academic Press, New York – London, 1959. Prijs $ 13.—.

De enorme toeneming van het aantal publikaties over virussen maakt het reeds lang onmogelijk het gehele vakgebied der virologie bij te houden en te overzien. Hetzelfde geldt reeds enige tijd voor de plantevirologie. Het moet daarom gelukkig worden geacht, dat specialisten zich van tijd tot tijd zetten tot het samenvatten van datgene, wat tot dusver bekend is geworden op het gebied van hun specialisme. Het is daarbij vooral van belang, dat deze specialisten gezamenlijk komen tot een verantwoorde aanduiding van de samenhang tussen de verschillende richtingen. Eerst dan kan een all-round overzicht worden verkregen over het bewuste vakgebied.

De resultaten van een dergelijk streven met betrekking tot het gehele terrein van de virologie zijn bezig uit te kristalliseren in een driedelig werk: „The viruses, biochemical, biological, and biophysical properties." Het werk wordt geredigeerd door de bekwame virologen Dr. F. M. BURNETT, directeur van „The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research", Melbourne, Australia, en Dr. W. M. STANLEY, directeur van het bekende „Virus Laboratory" van

de University of California, Berkeley, California, U.S.A. Het tweede deel, dat handelt over plante- en bacterievirussen, is als eerste verschenen. Het eerste deel zal de algemene virologie behandelen, terwijl het derde deel zal gaan over de diervirussen.

Het tweede deel bevat de volgende bijdragen: 1. S. G. WILDMAN: The process of infection and virus synthesis with tobacco mosaic virus and other plant viruses. 2. R. MARKHAM: The biochemistry of plant viruses. 3. C. A. KNIGHT: Variation and its chemical correlates. 4. L. M. BLACK: Biological cycles of plant viruses in insect vectors. 5. A. LWOFF: Bacteriophage as a model of host-virus relationship. 6. A. GAREN & L. M. KOZLOFF: The initiation of bacteriophage infection. 7. G. S. STENT: Intracellular multiplication of bacterial viruses. 8. C. LEVINTHAL: Bacteriophage genetics. 9. F. JACOB & E. L. WOLLMAN: Lysogeny. 10. F. W. STAHL: Radiobiology of bacteriophage.

De bijdragen leveren prettig leesbare, systematisch behandelde overzichten. Het bijeen brengen van een groot aantal onderwerpen in een betrekkelijk klein deel houdt uiteraard in, dat hier niet sprake is van een gedetailleerd handboek. Het boek is goed gedrukt. De tekst is zeer overzichtelijk ingedeeld. Het aantal afbeeldingen is zeer beperkt. Een auteurs- en een onderwerpenregister vergemakkelijken het gebruik als naslagwerk.

Uit bovenstaande opsomming, evenals uit de ondertitel van het gehele werk, blijkt dat vooral de fundamentele aspecten der virussen en van hun werking zijn behandeld, nl. hun chemische, biologische en biofysische eigenschappen. De lezer verwachte dus geen pathologische gegevens betreffende de reactie van de waardplant, of in het algemeen van de gastheer der virussen. Tot voor kort lag het zwaartepunt in de virologie juist op dit laatste aspect. Daar dierlijke organismen in hun reactievermogen totaal verschillen van bacteriën en deze weer van planten, is het begrijpelijk dat de diervirologie, de bacteriofagie en de plantevirologie ieder voor zich eigen wegen gingen, met eigen problemen en eigen methodieken. Nu de wetenschap echter snelle vorderingen maakt en de vooruitgang der techniek de studie van steeds meer eigenschappen van de ziekteverwekkende virussen zelf mogelijk maakt, blijken de drie richtingen in de virologie in toenemende mate voor gemeenschappelijke problemen te staan.

Bevordering van de studie van de in dit werk besproken eigenschappen der virussen moet van grote betekenis worden geacht, niet alleen voor de vooruitgang in de wetenschappelijke virologie. Het is ook van wezenlijke waarde voor de virologie als pathologie, zo ook voor de plantevirologie als onderdeel van de planteziektenkunde. Het gaat hier immers om de intrinsieke eigenschappen der virussen zelf. Kennis en studie hiervan is onmisbaar voor de enig juiste identificatie van het steeds toenemende aantal bekend wordende virussen. Waar een juiste identificatie, en via deze een juiste virusclassificatie, de enig betrouwbare basis kan zijn voor de uiteindelijke diagnostiek, is de studie der intrinsieke eigenschappen dus ook van grote praktisch fytopathologische waarde. Kennisneming van dit boek wordt daarom volgaarne aanbevolen.

L. Bos

W. C. MOORE, British parasitic fungi. Cambridge University Press, 1959; 16 + 429 blz.; prijs: 45 s. geb.

Naslagwerk over parasitaire schimmels van gekweekte planten in Groot-Brittannië, de ziekte-verschijnselen, die zij veroorzaken en de desbetreffende Britse literatuur. Het boek bestaat uit twee delen. Het eerste deel omvat de wetenschappelijke- en de praktijknamen van de waardplanten met daaronder de wetenschappelijke namen van de parasitaire schimmels in alfabetische volgorde. Het tweede deel omvat de parasitaire schimmels in alfabetische volgorde, hun synoniemen en eventueel het conidiën-stadium. Vermeld worden telkens de ziekteverschijnselen der waardplanten en de verspreiding in Groot-Brittannië. Voor mycologen en fytopathologen een uitstekend handboek; alleen jammer dat uitsluitend naar de Britse literatuur verwezen wordt.

G.

J. B. GOODEY, MARY T. FRANKLIN & D. J. HOOPER, Supplement to The nematode parasites of plants catalogued under their hosts, 1955–1958. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Nr. Slough, Bucks., 1959; prijs 7s.6d.

Dit supplement bevat de tussen 1955 en 1958 gepubliceerde nieuwe waardplanten van aaltjes. Het is op dezelfde wijze ingericht als het in 1956 gepubliceerde hoofdwerk (zie dit tijdschrift 63, blz. 32). De plantesoorten zijn weer in twee groepen: Phanerogamen en Cryptogamen alfabetisch volgens hun Latijnse namen gerangschikt en bij elke soort zijn de aaltjessoorten vermeld, die hierop volgens de literatuur zijn gevonden. De laatste is in een uitvoerige lijst samengebracht. De omvang van het supplement (65 blz. tegen 140 blz. voor de oorspronkelijke publikatie) geeft een indruk van de sterke toeneming van het aaltjesonderzoek in de laatste jaren.

J. W. SEINHORST